대한내과학회지 : 제 56 권 제 2 호 1999

백서 폐동맥 내피세포에서 cytokine 및 내독소에 의한 nitric oxide 생성과 미토콘드리아 aconitase 활성도의 관계

연세대학교 의과대학 내과학교실, 미생물학교실*, 유타대학교 의과대학 호흡기내과**

장상호 · 장 준 · 박전한* · 김세규 · 김세종* · 김성규
Boaz A. Markewitz** · 이원영 · John R. Michael**

서 론

산화질소(nitric oxide: NO.)는 혈관 내피세포 기원 이완인자(endothelium-derived relaxing factor)로서 혈관 및 신경계의 생리적 조절에 중요한 messenger이다[1]. 혈관 내피세포에는 구성형(constitutive form)의 nitric oxide synthase(cNOS)가 있어 정상 조건에서 지속적으로 소량의 NO를 생성한다[2, 3]. 이 NO는 폐혈관을 확장시켜 폐혈류를 정상적으로 유지시키고 폐혈관압을 낮게 유지시키는 역할을 한다[1].

혈관 내피세포에는 유도형(inducible form) iNOS가 공히 존재함이 밝혀졌다[4]. iNOS는 대식세포의 경우 내독소, interferon γ(IFN γ), tumor necrosis factor α(TNF α) 등의 자극에 의하여 활성화되어[5], picomole 수준의 cNOS보다 많은양의 NO를 nanomole 수준으로 장시간 지속적으로 생성 및 방출함으로써, 세균, 진균, 기생충 등의 살해 및 억제, 종양세포 살해를 하는 등 생체 방어 기구의 일원으로 작용한다[6, 7]. 그러나 혈관 내피세포에서 iNOS의 생리적 기능이 명확하게 밝혀지지는 않았다[1].

중증의 급성 호흡곤란 증후군에서 기계환기 중에 NO를 80 ppm 이내의 낮은 농도로 흡입하여 폐 동맥 고혈압을 완화시키고 폐환기 관류 불균형을 개선시키는 치료목적의 실험적 연구를 시도하고 있다[8]. 이렇게 폐손상에서 폐동맥 고혈압을 방지하거나 치료하는데 사용되는 NO이지만, NO가 생성됨으로써 주변 세포나 NO생성을 한 내피세포 자체의 기능을 억제 혹은 손상시킬 가능성도 있다[9, 10]. 이는 면역복합체에 의한 폐혈관 손상이 NOS 억제제로 완화된다는 연구로 이의 추정이 가능하다[11].

NO는 철과 쉽게 반응하므로 iron-sulfur 구조체가 촉매작용의 주된 역할을 하는 효소의 기능에 영향을 미칠 가능성이 있다[7]. NO가 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 생성하면 peroxynitrite가 분해되면서 hydroxyl 라디칼이 발생하므로 조직의 산화물 손상을 가중시킬 가능성도 시사되었다[9, 12].

급성 폐손상 및 급성 호흡곤란증후군의 병인에서 내독소혈증이 주요 원인이며 INF γ, TNF α 등의 cytokines가 다량 나오고 TNF α가 세포 손상의 주된 요인이다[13]. INF γ, TNF α, 내독소를 복합하여 자극하면 iNOS를 활성화시킬 수 있다고 하나 어떤 자극제의 조합과 용량으로 iNOS 자극이 가능한지 여부는 각각의 세포에 따라 다르다[1]. 백서의 대식세포에서는 iNOS 활성화가 직접적으로 입증되었지만 인체 대식세포에서는 여러가지 자극과 조건을 복합하여도 iNOS 자극을 직접적으로 입증하지는 못했다[1]. 그리고 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란증후군의 병인에서 중요한 폐 미세혈관 내피세포를 자극하여 NO 생성이 유발될 경우 내피세포의 기능, 특히 iron-sulfur 구조체가 기능에 중요한 미토콘드리아 aconitase의 활성도가 NO 생성에 의하여 어떤 영향을 받는지 조사된 바 없다. 내독소 쇼크에서 TNF α가 가장 중요한 cytokine이고 폐 미세혈관은 대혈관 내피세포와 달리 TNF α로 손상을 받지 않으며[14], 내독소 쇼크와 급성 폐손상에서는 미세혈관 내피세포가 중요하기 때문에 이를 실험 재료로 하여 연구를 하였다.

대식세포의 경우 NO 생성 유도에 IFN γ가 priming에 중요하며 최대 자극에는 TNF α, 내독소에 해당하는 세균 lipopolysaccharide(LPS) 등이 필요하다[7]. 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란증후군의 병인에 유사하게 LPS를 포함하여 iNOS에 중요한 IFN γ, 내독소 쇼크에서 중요한 cytokine인 TNF α 등을 복합하여 NO 생성을 촉진시

접 수 : 1998년 11월 20일
통 과 : 1999년 1월 14일
본 논문의 요지는 1997년 5월 18일 American Thoracic Society 1997 International Conference에서 발표되었음

킬 수 있는지 여부와 iNOS 자극에 필요한 자극의 조합 및 그 용량을 조사하였다. NO생성을 확인한 후 iron-sulfur 구조체가 촉매작용의 주된 역할을 하는 효소인 미토콘드리아 aconitase 활성도가 NO 생성시 변화하는지 여부를 조사하는 동시에 NOS 길항제인 N-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)의 병용 투여로 NO생성을 억제하였을 때 미토콘드리아 aconitase 활성도 변화가 나타나지 않음을 확인하여 미토콘드리아 aconitase 활성도 변화가 NO 생성과 연관이 있는지 여부 및 NOS 억제제의 내피세포 기능 보호 가능성 등을 검토하였다.

대상 및 방법

1. 실험 재료

백서 폐미세혈관 내피세포(rat lung microvascular endothelial cell)는 microcarrier beads를 이용하여 분리한 세포를 John R. Michael교수(유타대학교, Salt Lake City, Utah, USA)로 부터 제공받았다. 이 세포는 광학현미경 및 전자 현미경 상 조약돌(cobblestone) 형태이고, 제 VIII인자 항원의 존재와 acetylated low density lipoproteins 섭취로 내피세포임을 확인하였다. 배양 배지는 Ryan's red medium(M-199 medium, 6.7% bovine calf serum, 3.3% fetal bovine serum, 10-5 M thymidine, penicillin 60 units/mL, streptomycin 60 μg/mL, gentamicin 20 μg/mL)을 사용하여 섭씨 37도, 5% 이산화탄소를 보충한 항온 배양기에서 배양하였다. 세포는 trypsin 같은 효소를 사용하지 않고 세포 찰과기(scraper)로 긁어서 계대하였다[15].

2. 실험방법

가. Nitric oxide 생성 유발

배양한 백서 폐혈관 내피세포를 12 well plates에서 95% 이상 융합(coalescent)되도록 한후 iNOS를 자극하기 위하여 rat recombinant IFN γ(Gibco BRL, Grand Island, New York, U.S.A.) 250 U/mL 및 500 U/mL, human recombinant TNF α(Genzyme, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.) 150 U/mL 및 300 U/mL, *E. coli* serotype 0128:B12 lipopolysaccharide(Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, U.S.A.) 5 μg/mL 및 10 μg/mL을 여러가지 조합으로 배양액에 첨가하고 각 well당 0.5 mL씩 48시간까지 처치해서 NO 생성여부를 배양액내 nitrite 농도 측정으로 평가하였다. 이 실험은 제한된 양의 세포를 가지고 다양한 조합의 자극을 시험하기 위하여 12 well plate에서 시행하였다.

나. 아질산염(nitrite) 측정에 의한 nitric oxide 생성 평가

세포배양액을 각 실험군에서 채집하여 원심 침전후 상층액을 96 well plate에 각 well당 50 mL씩 넣고 30% 초산(acetic acid) 중 1% sulfanilamide 용액, 60% 초산 중 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 용액을 각각 1:1 혼합한 Greiss reagent를 100 mL씩 첨가하여 발색반응을 일으킨 후 microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 세포 배양액에 sodium nitrite를 첨가하여 얻은 표준곡선(standard curve)와 대조함으로써 nitrite 농도를 결정하였다[4].

다. 미토콘드리아 aconitase 활성도 측정

6 well plates에서 대조군은 단순 세포배양액으로, iNOS 자극군은 NO 생성을 자극하기 위하여 IFN γ 500 U/mL, TNF α 300 U/mL, LPS 5 μg/mL으로, iNOS 억제군은 iNOS 억제제인 N-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) 0.5 mM, IFN γ 500 U/mL, TNF α 300 U/mL, LPS 5 μg/mL으로 각 well 당 1 mL씩의 배양액을 24시간 동안 처치하였다. 각각 다른 실험일에 4회의 실험으로 각 군의 nitrite 농도 및 미토콘드리아 aconitase 활성도를 측정하였다

미토콘드리아 aconitase 활성도 측정은 6 well plates에서 세포를 찰과(scraping)하여 6 well의 세포를 하나로 모은 후 원심분리(400*g*, 5분)하고 0.007% digitonin으로 투과화(permeabilize)하여 세포질 단백질을 제거하였으며, 다시 phosphate buffered saline을 첨가하고 원심분리로 2회 세척하였다. 세포를 50 mM Tris buffer(pH 7.2)에 부유시키고 Triton-X를 0.2%로 처리하여 원심분리(3000*g*, 10분)한 상층액을 검체로 사용하였다. 1 mL cuvette에 50 μL의 검체를 첨가하여 최종 농도로 0.02% albumin, 0.2 mM *cis*-acotinic acid를 함유한 1 mL의 50 mM Tris buffer(pH 7.2)에서 *cis*-acotinic acid의 감소를 분광광도계(spectrophotometer)로 240 nm에서 측정하였다[7]. Aconitase 활성도는 *cis*-acotinic acid 감소속도를 3.41 cm^{-1} mM^{-1}의 extinction coefficient로 계산하여 이를 nmole/min으로 표현하였다[16].

라. 통계적 분석

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유

의성을 분산분석(analysis of variance: ANOVA) 및 Student unpaired t-test로 검정하였다. 모든 결과의 분석에서 *P* 값 0.05 미만인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. Nitric oxide 생성

백서 폐 미세혈관 내피세포의 무처치 대조군, IFNγ 250 U/mL 및 500 U/mL, TNFα 150 U/mL 및 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 및 10 μg/mL 단일 자극군에서는 48시간까지 nitrite 생성이 측정이 되지 않았다. NO 생성의 자극이 가능한지 여부와 가장 자극이 잘 되는 조합을 조사하고자 12 well plates에서 상기 자극제를 복합하여 각 well 당 0.5 mL씩 처치하였을 때 12시간 부터 nitrite가 측정 가능하였으며 48시간까지도 배양액 중 nitrite가 증가하였다. 배양액 중 nitrite 농도가 24시간에 TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군에서 12±6.5 μM으로 가장 낮고 IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군에서 70±12.9 μM로 가장 높았으며 IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군이 IFNγ가 없거나 250 U/mL인 군 및 LPS가 없는 군에 비하여 유의하게 nitrite가 높았다(n = 3, $P < 0.05$; Fig. 1A).

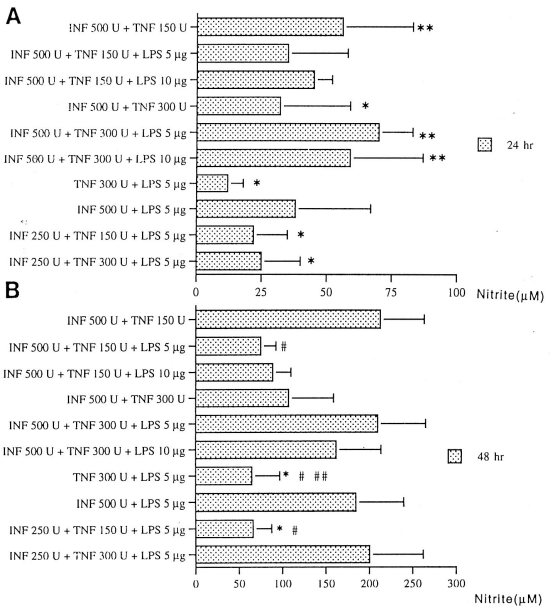

Fig. 1. Measurements of nitrite in the medium from 12 well plates of rat lung microvascular endothelial cells treated with various combinations of interferon(INF; unit/mL), tumor necrosis factor (TNF; unit/mL) or lipopolysaccharide (LPS; μg /mL) for A: 24 hours and B: 48 hours. Each well contained 0.5 mL of Ryan's medium. Values are mean±SD. N = 3 for each condition. *: P<0.05 vs INF 500 U + TNF 300 U + LPS 5 μg. **: P<0.05 vs TNF 300 U + LPS 5 μg. #: P<0.05 vs INF 500 U + TNF 150 U. ##: P<0.05 vs INF 250 U + TNF 300 U + LPS 5 μg.

배양액 중 nitrite 농도가 48시간에 IFN 500 U/mL, TNFα 150 U/mL 자극군이 이 2가지 자극에 LPS 5 μg /mL이 추가된 군 및 IFNγ이 없는 군에 비하여 높았고 (n=3; $P < 0.05$); IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군도 다른 조건은 동일하면서 IFNγ가 없는 군에 비하여 유의하게 높았으나(n=3; $P < 0.05$), 다른 조건은 동일하면서 IFNγ가 250 U/mL인 군에 비해서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 1B).

2. 미토콘드리아 aconitase 활성도

미토콘드리아 aconitase 실험에서 자극제를 복합하여 6 well plates에서 각 well 당 1 mL씩 24시간 동안 처치 시 nitrite 농도는 IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군에서 20±1.0 μM으로 무처치 대조군의 0.7 μM에 비하여 유의하게 증가하였고(n = 4 ; P 0.05), IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg /mL, L-NMMA 0.5 mM 군에서 3±0.5 μM로 L-NMMA에 의하여 NO 생성이 유의하게 억제되었다 (n=4 ; $P<0.05$)(Fig. 2A).

미토콘드리아 aconitase 활성도는 무처치 대조군의 48±14 nmole/min에 비하여 IFN 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군에서 19±6 nmole/min으로 유의하게 감소되었고(n=4 ; $P< 0.05$), IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL, L-NMMA 0.5 mM 군에서 34±8 nmole/min이었다(Fig. 2B). 미토콘드리아 aconitase 활성도를 단백치로 보정하면 대조군의 196±8 nmole/min/㎎ of protein에 비하여 IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군에서 102±34 nmole/min/㎎ of protein으로 유의하게 감소하였고(n=4 ; $P<0.05$), IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL, L-NMMA 0.5 mM 군에서 161±24 nmole/ min/㎎ of protein으로 자극군에 비하여 유의하게 높았으나(n=4 ; $P<0.05$), 대조군에 비하여는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 2C).

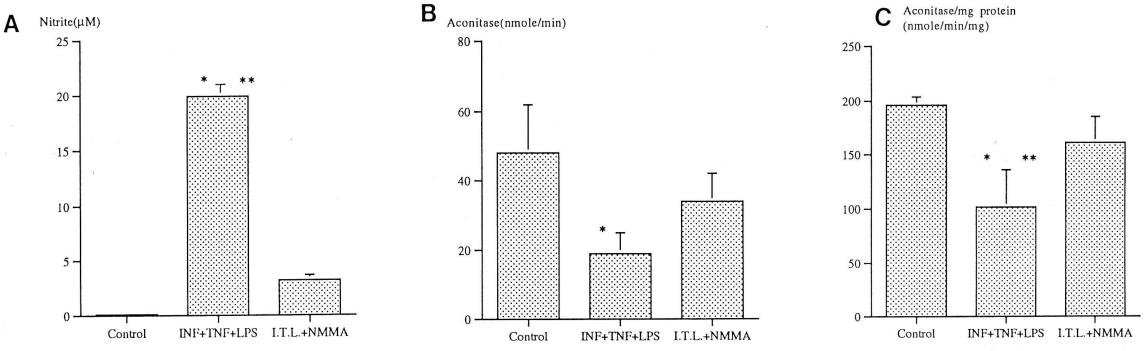

Fig. 2. A: Measurements of nitrite in the medium, B: the activity of mitochondrial aconitase and C: the activity of mitochondrial aconitase per mg of protein from 6 well plates of rat lung microvascular endothelial cells. INF + TNF + LPS were cells treated with interferonγ (500 unit/mL), tumor necrosis factorα (300 unit/mL) or lipopolysaccharide (5 μg/mL) for 24 hours. I.T.L. + NMMA were cells treated with interferonγ, tumor necrosis factorα, lipopolysaccharide and N-monomethyl-L-arginine (0.5 mM). Each well contained 1 mL of Ryan's medium. Values are mean±SD. N=4 for each condition. *: $P<0.05$ vs control and **: $P<0.05$ vs I.T.L. + NMMA

고 찰

NO.는 생체내에서 생성되는 자유 라디칼로서 혈관 긴장도, 혈소판 응집, 혈관 내피세포에 대한 백혈구 유착, 감염에 대한 숙주 방어 등에서 중요한 역할을 한다[10, 15, 17]. 염증성 및 병리적 상태의 실험 모델에서 NO는 조직 손상을 촉진할 수도 혹은 억제할 수도 있다[10]. 산화물 손상에서 NO가 손상을 증가시킬지 혹은 감소시킬지는 여러 요인들의 균형에 관련되어 있을 것으로 추정한다. 즉 어떤 종류의 산화물이 어떤 양으로 생성되는지, NO의 생성율, 이들이 생성되는 세포와 해부학적 위치, 각 세포의 감수성 등 복잡한 요인이 관계된다[9, 12, 15].

패혈증성 쇼크에 의한 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란 증후군에서는 폐혈관 내피세포 및 호중구의 상호작용이 매우 중요한 병인으로 알려져 있으며[13], 최근 이의 치료에 NO의 흡입요법이 시도되고 있는가 하면 NOS 길항제의 투여로 패혈증성 쇼크의 저혈압을 교정 시킬 수 있었던[18] 반면 폐손상이나 실험동물의 치명율이 증가할 수도 있다는 등의 상충된 보고가 있다[17, 19, 20]. 급성 호흡곤란증후군 혹은 이의 발생 위험이 높은 환자의 폐 혹은 혈액 중에는 보체의 분절, interleukin-1, tumor necrosis factor, platelet activating factor, interleukin-6, interleukin-8 등의 염증성 자극물질이 증가되어 있는데 내독소는 이 물질들의 유리를 자극한다[13]. 혈관 내피세포에서 NO 생성을 자극하는 cytokines와 염증 매개물질이 동시에 xanthine oxidase에 의한 superoxide 생성을 자극하며, 내피세포에 유착하는 호중구도 superoxide를 방출한다. 아울러 내피세포도 xanthine oxidase에 의하여 산화물을 제공할 가능성이 있다. 과다 생성된 NO는 해당작용, 미토콘드리아 호흡 연쇄, DNA 복제 등을 저해할 수 있는데 이런 효과의 일부분은 NO와 superoxide로부터 생성된 peroxynitrite가 관여한다. 즉 NO와 반응성 산소기의 비가 산화 반응에 영향을 미치는데 NO와 superoxide가 1:1이면 peroxynitrite가 생성되어 지질 산화를 유발하지만, NO가 과다하면 오히려 peroxyl radical을 청소하여 지질 산화를 억제할 수도 있다[21, 22].

LPS 단독자극시 porcine aortic endothelium에서 세포독성이 나타나고 이를 L-NMMA로 억제할 수 있었던 반면[23], bovine aortic endothelial cell에서 LPS로 내피세포 투과성이 증가하지만 이 투과성 증가가 NOS 길항제로 영향을 받지 않고 LPS로 24시간 자극시 NO 생성이 증가하지 않는다는 보고도 있어[24], 동물에 따라 내피세포의 LPS에 대한 NO 반응에 차이가 있음도 밝혀져 있다. LPS에 의해서 세포 투과성이 증가하고 세포독성이 나타날 수 있으나[23] 본 연구에서 LPS를 포함한 자극에서 nitrite가 다량 생성되고 L-NMMA로 NO 생성을 억제했을 때 미토콘드리아 aconitase 활성도가 대조군에 비하여 유의한 차이가 없으므로 LPS나 TNFα에 의한 세포독성은 무시할 만한 수준 이내로 추정된다. L-NMMA로 NO 생성을 억제했을 때 미토콘드리아 aconitase 활성도가 유의한 차이는 아니지만 대조군보다 다소 낮은 경향의 원인이 내피세포가 LPS 자극으로 투과성이 증가해서 나타난 변화일 가능성, 혹은 L-NMMA 투여시에도 nitrite가 소량 생성되었으므로 소량의 NO에 의한 차이

일 가능성 등도 있다.

NO가 과다 생성되는 내독소 쇼크에서 NOS 길항제 투여로 혈압이 정상화되는[18] 긍정적 효과가 있는 반면, 혈관 내피세포에서 NO 생성이 감소하므로 백혈구와 혈소판의 미세혈관에 대한 유착 및 응집이 억제되지 않아 미세혈관 손상이 증가하고 폐손상도 증가할 가능성이 있다[17,25,26]. 생체 내에서는 NO가 내피세포 뿐만 아니라 백혈구, 혈소판의 작용에도 영향을 미치고 L-NMMA 등의 NOS 길항제가 iNOS와 cNOS를 모두 억제하므로 미세혈관 긴장도와 혈류 조절에 관여하는 내피세포의 cNOS 및 이에 반응하는 혈관 평활근, 자율신경계의 비아드레날린성 비콜린성 신경전달 등에 대한 영향이 복합되어 생체내 효과는 예측이 어렵다. 그러나 최근 NOS 종류에 따라 선택성이 높은 NOS 길항제의 개발이 보고되므로 이의 응용 가능성이 있다[10,27].

IFN γ, TNF α, interleukin-1, LPS 등은 내피세포 종류에 따라서는 단독으로도 iNOS 생성을 유도할 수 있으나[28], 본 연구에서 IFN γ, TNF α, LPS의 각기 단독 자극으로는 24-48시간까지 nitrite 농도의 증가가 관찰되지 않았고 NO 생성에 2종 이상의 자극이 필요하였다. 이는 대식세포나 큰 동맥의 내피세포에 비하여 미세혈관의 iNOS양이 적기 때문일 가능성이 있다. 미토콘드리아 aconitase 활성도에 관한 실험에는 nitrite 생성양이 가장 많고 측정값의 변이가 적은 IFN γ 500 U/mL, TNF α 300 U/mL, LPS 5 μg/mL의 복합 자극을 채택하였으며 이 세가지는 내독소 쇼크, 급성 폐손상, 급성 호흡곤란 증후군의 병인과 병태생리에 중요한 역할을 하므로 이를 채택하였다.

NO 생성을 NO 산화산물인 아질산염(nitrite)과 질산염(nitrate)을 측정하여 간접적으로 평가할 수 있다. Nitrate는 검체에 *E. coli* nitrate reductase를 처리하여 nitrite로 환원시켜서 검체내의 총 nitrite를 측정하고, 총 nitrite값에서 nitrate를 빼는 방식으로 측정한다. 본 연구에서는 nitrate 측정을 하지 않았는데 혈액에서는 NO에서 nitrite가 생성된 후 혈색소와의 반응으로 nitrate로 신속히 전환되지만, 혈장, 수용액, ultrafitrate 등에서는 NO가 nitrite로 산화된 후 상당시간 안정적이기 때문에 세포배지에서 NO 생성 확인에 nitrite 측정으로 충분하다고 한다[29].

세포독성을 발현한 활성화 대식세포는 다량의 NO를 방출함으로써 표적 세포내 철의 감소를 촉발시키고 이 때문에 철을 필수 보조인자(cofactor)로 하는 효소들의 기능이 억제된다[6,7,30]. 활성화된 대식세포 자신도 미토콘드리아 electron transport chain과 aconitase 활성도가 억제되나 NO의 독성을 어떻게 피하는지 그 기전이 명확히 밝혀져 있지 않다[1,7]. 다만 NO를 방출하는 활성화된 대식세포에서 유산(lactate) 생성이 증가하므로 포도당의 해당작용으로 ATP를 생성하여 에너지 공급을 유지하는 것이 대식세포 자신의 세포손상을 피하는 기전중 하나라고 추정하고 있다[7]. 본 실험에서 관찰된 IFN γ, TNF α, LPS 자극시의 미토콘드리아 aconitase 활성도 억제가 NO 생성 증가와 동반되고 NOS 길항제로 NO 생성 증가가 억제되면서 aconitase 활성도 억제가 저지되는 등 내피세포에서 NO 생성 자극시 내피세포 자신의 기능도 일부 억제될 수 있음을 관찰한 것이다. 그러나 이의 생체내 의의는 세포독성 연구, 혈관 투과성 측정, 동물의 장기나 개체실험 등으로 검토해 보아야 구명할 수 있으리라 추정한다.

결론적으로 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란 증후군에서 중요한 역할을 하는 IFN γ, TNF α, 내독소 등으로 백서 폐미세혈관 내피세포를 자극시 NO 생성이 증가하고 미토콘드리아 aconitase 활성도가 유의하게 감소되며 이 NO 생성과 미토콘드리아 aconitase 활성도 억제가 NMMA 병용 투여로 유의하게 저지되는 등 백서 폐미세혈관 내피세포에서 NO 다량 생성의 유도시 혈관 내피세포 미토콘드리아 aconitase 활성도 억제가 NO 생성과 관련됨을 확인하였다. NO의 과다생성을 L-NMMA로 억제했을 때 미토콘드리아 aconitase 활성도 억제가 저지되는 것은 세포수준에서 NOS 길항제의 긍정적 효과의 하나로 내독소 쇼크와 폐손상에서 치료제로서 NOS 길항제의 응용 가능성을 보다 적극적으로 검토할 필요가 있다.

요 약

연구배경: NO는 혈관 내피세포 기원 이완인자로서 혈관 및 신경계의 생리적 조절에 중요한 전령이며 혈관 내피세포에는 cNOS와 iNOS가 존재한다. 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란 증후군의 경우 내독소혈증이 주요 원인으로 INF γ, TNF α 등의 cytokines가 다량 나오고 TNF α가 세포 손상의 주된 요인이다. NO는 철과 쉽게 반응하므로 iron-sulfur 구조를 가진 미토콘드리아 aconitase 등의 주요 효소의 활성에 영향을 미칠 수 있다.

방법: 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란증후군의 병인에 유사하게 LPS를 포함하여 iNOS에 중요한 IFNγ, 내독소 쇼크에서 중요한 cytokine인 TNFα 등을 복합한 자극이 백서폐미세혈관 내피세포에서 NO 생성과 미토콘드리아 aconitase 활성도에 미치는 영향을 조사하였다.

결과: 24시간 동안 처치시 nitrite 농도는 IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군에서 20±1.0 μM으로 무처치 대조군의 0.7 μM에 비하여 유의하게 증가하였고(n=4 ; $P<0.05$), IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL, L-NMMA 0.5 mM 군에서 3±0.5 μM로 L-NMMA에 의하여 NO 생성이 유의하게 억제되었다 (n=4 ; $P<0.05$).

미토콘드리아 aconitase 활성도는 대조군의 196±8 nmole/min/㎎ of protein에 비하여 IFNγ 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL 자극군에서 102±34 nmole/min/㎎ of protein으로 유의하게 감소하였고(n=4 ; $P<0.05$), IFNα 500 U/mL, TNFα 300 U/mL, LPS 5 μg/mL, L-NMMA 0.5 mM 군에서 161±24 nmole/min/㎎ of protein으로 자극군에 비하여 유의하게 높았으나 (n=4 ; $P<0.05$), 대조군에 비하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

결론: IFNγ, TNFα, 내독소 등으로 백서 폐미세혈관 내피세포를 자극하여 NO 생성을 유도하면 미토콘드리아 aconitase 활성도가 유의하게 감소되는 등 자신의 일부 세포기능이 억제될 가능성을 확인하였다.

=Abstract=

The effect of cytokines and endotoxin on the nitric oxide production and its relation to mitochondrial aconitase activity in cultured rat lung microvascular endothelial cells

Sang Ho Jang, M.D., Joon Chang, M.D.
Jeon Han Park, M.D.*, Se Kyu Kim, M.D.
Se Jong Kim, M.D.*, Sung Kyu Kim, M.D.
Won Young Lee, M.D. Boaz A. Markewitz.M.D**
and John R. Michael, M.D.**

Departments of Internal Medicine and Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea; and Division of Respiratory, Critical Care and Occupational Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Veterans Affair Medical Center and University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah 84132, U.S.A.***

Objective : Both constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase exist in endothelial cells. Disorders that produce acute lung injury frequently release endotoxin and cytoknes, such as interferon(IFNγ) and tumor necrosis factor (TNFα). Endotoxin and these cytokines likely act as important mediators of cell injury. Because nitric oxide (NO) avidly reacts with iron, it may affect the activity of key enzymes, such as mitochondrial aconitase, which contain an iron-sulfur structure as a prosthetic group.

Method : We studied the effect of IFNγ, TNFα and *E. coli* lipopolysaccharide(LPS) on NO production and mitochondrial aconitase activity in cultured rat lung microvascular endothelial cells(RLMVC).

Result : Exposing RLMVC for 24 hours to IFNγ(500 U/mL), TNFα(300 U/mL) and LPS(5 μg/mL) significantly increases nitrite production to 20±1 μM compared to 0.07 μM in control cells($P<0.05$, n=4). Cytokine treatment also reduced mitochondrial aconitase activity from 196±8 to 102±34 nmole/min/mg of cell protein($P<0.05$, n=4). Treatment with the inhibitor of nitric oxide synthase N-monomethyl-L-arginine(NMMA) (0.5 mM) not only significantly blunted the cytokine- mediated increase in nitrite formation (3±0.5 μM vs 20±1 μM with cytokines, $P<0.05$, n=4), but also prevented the cytokine-mediated drop in aconitase activity (161± 24 vs. 196±8 nmole/min/mg of cell protein, NS).

Conclusion : Exposing RLMVC to IFNγ, TNFα and *E. coli* LPS substantially decreases mitochondrial aconitase activity. Nitric oxide appears to mediate this effect. Our results suggest that the excessive production of NO by endothelial cells, in response to cytokines and endotoxin, may inhibit the function of the endothelial cell itself.

Key Words : pulmonary arterial endothelial cell, nitric oxide, mitochondrial aconitase, interferon γ, tumor necrosis factor α, endotoxin

REFERENCES

1) Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: *Nitric oxide: A physiologic messenger. Ann Intern Med 120:227, 1994*
2) Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC,

Henderson AH: *The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. Nature 308:645, 1984*

3) Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D: *Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. J Pharmacol Exp Ther 287:529, 1986*
4) Gross SS, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG: *Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterine-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. Biochem Biophys Res Commun 178:823, 1991*
5) Nathan CF: *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB 6:3051, 1992*
6) Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z: *Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase and iminonitrogen oxidation to nitrite. Science 235:473, 1987*
7) Drapier JC, Hibbs JB: *Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulphur enzymes in the macrophage effector cells. J Immunol 140:2829, 1988*
8) Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Salma K, Pison U, Zapol WM: *Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome N Engl J Med 328: 399, 1993*
9) Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalynaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA: *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. J Biol Chem 269:26066, 1994*
10) Moncada S, Higgs EA: *Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. FASEB J 9: 1319, 1995*
11) Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA: *Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine-dependent. Proc Natl Acad Sci USA 88:6338, 1991*
12) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 87:1620, 1990*
13) Repine JE, Parsons PE: *Oxidant-antioxidant balance in endotoxin-induced oxidative injury and tolerance to oxidative injury. In Brigham KL ed. Endotoxin and the lungs. p207, New York, Marcel Dekker, Inc, 1994*
14) Meyrick B, Christrman B, Jesmok G: *Effects of recombinant tumor necrosis factor-alpha on cultured pulmonary artery and lung microvascular endothelial monolayer. Am J Pathol 138: 93, 1991*
15) Chang J, Rao NV, Markewitz BA, Hoidal JR, Michael JR: *Nitric oxide donor prevents hydrogen peroxide-mediated endothelial injury. Am J Physiol 270(Lung Cell Mol Phsiol 14): L931, 1996*
16) Fansler B, Lowenstein JM: *Aconitase from pig heart. Methods Enzymol 23:26, 1969*
17) Kubes PM, Suzuki M, Granger DN: *nitric oxide : an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 88:4651, 1991*
18) Petros A, Bennett D, Vallance P: *Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. Lancet 338:1557, 1991*
19) Vallance P, Moncada S: *Role of endogeneous nitric oxide in septic shock. New Horiz 1:77,1993*
20) Laszlo F, Whittle BJR, Moncada S: *Time-dependent enhancement or inhibition of endotoxin-induced vascular injury in rat intestine by nitric oxide synthase inhibitors. Br J Pharmacol 111:1309, 1994*
21) Darley-Usmar V, Wiseman M, Halliwell B: *Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Lett 369:131, 1995*
22) Kinnula VL, Crapo JD, Raivo KO: *Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. Lab Invest 73:3, 1995*
23) Palmer RMJ, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S: *The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. Br J Pharmacol 105: 11, 1992*
24) Berman RS, Frew JD, Martin W: *endotoxin-induced arterial endothelial barrier dysfunction assessed by an in vitro model. Br J Pharmacol 110:1282, 1993*
25) Harbrecht BG, Briller TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, Simmons RL: *Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and oxygen radical-mediated hepatic injury. J Leukoc Biol 52:390, 1992*
26) Wink DA, Haubauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB: *Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci USA 90:9813, 1993*
27) Fukuto JM, Chaudhuri G: *Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. Annual Rev Pharmacol Toxicol 35: 165, 1995*
28) Kilbourn RG, Belloni P: *Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon-gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. J Natl Cancer Inst 82: 772, 1990*

29) Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE: *Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr,Higgs EA, eds. The biology of nitric oxide., p 319, London, Portland Press, 1992*

30) Stadler J, Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, Ochoa JB, Simons RL: *Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. Am J Physiol 260:c910, 1991*